



ГЕНЕТИКА

УДК 575.17

КОМБИНАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ *rs12444979* И *rs2241423* АССОЦИИРОВАНА С РАЗВИТИЕМ ГИПЕРПЛАСТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ МАТКИ

THE COMBINATION OF GENETIC *RS12444979* AND *RS2241423* OPTIONS IS ASSOCIATED WITH DEVELOPMENT OF HYPER PLASTIC PROCESSES OF THE UTERUS

О.Б. Алтухова, И.В. Кривошей
O.B. Altukhova, I.V. Krivoshei

Белгородский государственный национальный исследовательский университет
308015, г.Белгород, ул. Победы, д. 85
Belgorod national research university
308015, Belgorod, Pobedy St., 85

e-mail: Krivoshei.i.v@yandex.ru

Резюме. В статье освещаются данные биоинформатического анализа пяти полиморфных локусов среди 947 пациенток с гиперпластическими процессами матки и 988 женщин контрольной группы. Установлено, что повышенный риск развития гиперпластических процессов матки у женщин Центрального региона России связан с комбинацией аллелей C *rs12444979* с G *rs2241423* (OR=1.57), а протективное действие имеют сочетания следующих молекулярно-генетических маркеров: C *rs12444979* с A *rs999460* с G *rs2241423* с G *rs6732220* (OR=0.67), A *rs999460* с G *rs2241423* с G *rs6732220* (OR=0.69), C *rs12444979* с A *rs999460* с G *rs6732220* (OR=0.71) и A *rs999460* с G *rs6732220* (OR=0.72).

Summary. The article highlights the bioinformatics data analysis of five polymorphic loci among 947 patients with uterine hyperplasia and 988 women in the control group. It was found that the increased risk of hyperplastic processes of the uterus in women of the Central region of Russia is related to a combination of alleles of C *rs12444979* with G *rs2241423* (OR = 1.57), and the protective effect of the combination have the following molecular genetic markers: C *rs12444979* with A *rs999460* with G *rs2241423* with G *rs6732220* (OR = 0.67), A *rs999460* with G *rs2241423* with G *rs6732220* (OR = 0.69), C *rs12444979* with A *rs999460* with G *rs6732220* (OR = 0.71) and A *rs999460* with G *rs6732220* (OR = 0.72).

Key words: hyperplastic processes of the uterus, genetic polymorphism, bioinformatics.

Ключевые слова: гиперпластические процессы матки, генетический полиморфизм, биоинформатика.

Введение

Гиперпластические процессы матки (ГПМ) (миома матки, генитальный эндометриоз, гиперпластические процессы эндометрия) занимают ведущее место в структуре общей гинекологической заболеваемости. Они имеют общие звенья патогенеза и поэтому достаточно часто встречаются сочетано [Klatsky et al., 2008]. Основными клиническими проявлениями этих заболеваний являются маточные кровотечения, тазовые боли, бесплодие и невынашивание беременности [Taran et al., 2014].

Миома матки представляет собой доброкачественную и, как правило, множественную опухоль, растущая из незрелых миоцитов сосудистой стенки матки [Churnosov et al., 2014; Tan et al., 2014]. Эндометриоз – патологический процесс, характеризующийся ростом и развитием ткани, идентичной по структуре и функции с эндометрием, за пределами границ нормальной локализации слизистой оболочки тела матки [Truskinovsky et al., 2014]. Гиперпластические процессы эндометрия трактуются как нефизиологическая пролиферация желез эндометрия, которая сопровождается структурной перестройкой железистого и, в меньшей степени, стромального компонентов эндометрия [Donato et al., 2014; Pachomov et al., 2014].



Принято считать, что миома матки, генитальный эндометриоз, гиперпластические процессы эндометрия являются гормональнозависимыми процессами. Ведущее место в патогенезе ГПМ отводится избыточной эстрогенной стимуляции, сочетающейся с недостаточностью прогестеронового воздействия [Kim et al., 2013]. Однако до настоящего времени не существует единого представления о механизмах развития доброкачественных опухолевых процессах в тканях матки.

Одним из факторов, определяющих развитие ГПМ, может являться возраст менархе и связанные с ним гены-кандидаты [Elks et al., 2010].

Цель

Целью нашей работы стало изучение роли комбинаций полиморфизмов генов rs12444979, rs999460, rs2241423, rs6732220 и rs4953616 в формировании гиперпластических процессов матки.

Объекты и методы исследования

Проведен анализ результатов наблюдений 1935 человек: 947 больных с ГПМ и 988 женщин контрольной группы. В выборки больных и контроля включались женщины русской национальности, являющиеся уроженками Центрального Черноземья РФ и не состоящие в родстве между собой. Клинико-инструментальное обследование пациенток с гиперпластическими процессами матки осуществлялось врачами гинекологического отделения Перинатального центра Белгородской областной клинической больницы Святителя Иоасафа. В контрольную группу включались женщины без гинекологических заболеваний.

Всем больным с гиперпластическими процессами матки и индивидуумам контрольной группы проводилось типирование пяти молекулярного-генетических маркеров: CNVs g.19933600C>T (rs12444979), SFTA3 c.-2153G>A (rs999460), MAP2K5 c.1135-12146G>A (rs2241423), FSHR c.375-5096C>G (rs6732220), LHCGR c.3441+42609C>T (rs4953616).

В качестве материала для исследования служила венозная кровь в объеме 8-9 мл, взятая из локтевой вены пробанда. Выделение геномной ДНК из периферической крови проведено стандартным методом фенол-хлороформной экстракции [Miller et al., 1988]. Анализ исследуемых локусов осуществлялся методом полимеразной цепной реакции синтеза ДНК с использованием олигонуклеотидных праймеров и зондов.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программных пакетов «STATISTICA for Windows 6.0» и «Microsoft Excel 2007». Для анализа соответствия наблюдаемого распределения генотипов ожидаемому, исходя из равновесия Харди-Вайнберга, использован критерий χ^2 [Реброва, 2006].

Анализ роли комбинаций исследуемых генов в формировании гиперпластических процессов матки проведен с помощью программного обеспечения APSampler, использующего метод Монте-Карло марковскими цепями и байесовскую непараметрическую статистику [Favorov et al., 2005]. При проведении множественных сравнений с целью минимизации ошибок первого рода использовали пермутационный тест (p_{perm}).

Результаты и их обсуждение

Анализ полиморфизмов генов проводили на материале двух выборок: 947 пациенток с ГПМ и 988 женщин контрольной группы. В выборки больных и контроля включались женщины русской национальности, являющиеся уроженками Центрального региона России и не состоящие в родстве между собой. Пациенты включались в группу больных только после установления диагноза заболевания, подтвержденного с помощью клинических и лабораторно-инструментальных методов обследования. Клинико-лабораторное обследование больных проводилось на базе гинекологического отделения перинатального центра Белгородской областной клинической больницы Святителя Иоасафа.

Исследование частот аллелей изучаемых полиморфных маркеров генов выявлено, что для всех изученных локусов в группе больных с ГПМ и в контрольной выборке эмпирическое распределение генотипов соответствует теоретически ожидаемому при равновесии Харди-Вайнберга ($p > 0.05$) (табл. 1).

В результате проведенного биоинформатического анализа носительства сочетаний аллелей и генотипов исследуемых локусов выявлен ряд достоверных различий между больными ГПМ и контролем (табл. 2).

В первую очередь обращает на себя внимание высокодостоверная ($P_{perm} = 1.6 \cdot 10^{-6}$) ассоциация сочетания аллелей С rs12444979 с А rs999460 с G rs2241423 и G rs6732220 с формированием ГПМ. Данное сочетание имеют 19.65% больных с ГПМ, а среди контрольной группы составляет 26.63%. Эта комбинация полиморфных вариантов генов является протективным фактором развития ГПМ, о чем свидетельствует величина OR, равная 0.67 при 95% доверительном интервале 0.54-0.84.



Таблица 1

Распределение генотипов, наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности, индекса фиксации полиморфных маркеров исследуемых генов среди больных ГПМ и в контроле
Distribution of genotypes, the observed and expected heterozygosity, an index of fixing of polymorphic markers of the studied genes among sick GPM and in control

Локусы, показатели			Больные ГПМ (n=947)	Контрольная группа (n=988)
rs12444979	ΣN		887	961
	N _o (N _e)	CC	649 (652.04)	702 (698.83)
		TC	223 (216.92)	235 (241.33)
		TT	15 (18.04)	24 (20.83)
	χ ² (HWE) (p)		0.70 (>0.05)	0.66 (>0.05)
	H _o (H _e)		0.25 (0.24)	0.24 (0.25)
	D (t)		+0.03 (0.36)	-0.03 (0.37)
rs999460	ΣN		908	963
	N _o (N _e)	GG	419 (414.52)	646 (641.53)
		GA	389 (397.96)	280 (288.93)
		AA	100 (95.52)	37 (32.53)
	χ ² (HWE) (p)		0.46 (>0.05)	0.92 (>0.05)
	H _o (H _e)		0.43 (0.44)	0.29 (0.30)
	D (t)		-0.02 (0.54)	-0.03 (0.50)
rs2241423	ΣN		902	959
	N _o (N _e)	GG	614 (617.81)	646 (641.53)
		GA	265 (257.39)	280 (288.93)
		AA	23 (26.81)	37 (32.53)
	χ ² (HWE) (p)		0.79 (>0.05)	1.36 (>0.05)
	H _o (H _e)		0.29 (0.28)	0.50 (0.49)
	D (t)		+0.03 (0.44)	+0.04 (1.10)
rs6732220	ΣN		903	968
	N _o (N _e)	CC	517 (518.11)	533 (534.79)
		CG	334 (331.77)	373 (369.41)
		GG	52 (53.11)	62 (63.79)
	χ ² (HWE) (p)		0.04 (>0.05)	0.09 (>0.05)
	H _o (H _e)		0.37 (0.37)	0.38 (0.38)
	D (t)		+0.01 (0.13)	+0.01 (0.20)
rs4953616	ΣN		886	959
	N _o (N _e)	CC	440 (447.97)	480 (492.86)
		CT	380 (364.06)	415 (389.27)
		TT	66 (73.97)	64 (76.86)
	χ ² (HWE) (p)		1.70 (>0.05)	4.19 (>0.05)
	H _o (H _e)		0.43 (0.41)	0.43 (0.40)
	D (t)		+0.04 (0.95)	+0.06 (1.46)



Таблица 2

Распространенность некоторых сочетаний изучаемых полиморфных маркеров
у больных ГПМ и в контрольной группе
Prevalence of some combinations of the studied polymorphic markers at sick GPM and in control group

Полиморфизмы	Сочетания (аллелей)	Больные ГПМ (n=947)		Контрольная группа (n=988)		P (Pperm)	OR (95% CI)
		n/N	%	n/N	%		
rs12444979, rs999460, rs2241423, rs6732220	C rs12444979 совместно с A rs999460 совместно с G rs2241423 совместно с G rs6732220	171/870	19.65	253/950	26.63	0.0002 (1.6*10 ⁻⁶)	0.67 (0.54- 0.84)
rs999460, rs2241423, rs6732220	A rs999460 совместно с G rs2241423 совместно с G rs6732220	183/887	20.63	262/955	27.43	0.0004 (6.3*10 ⁻⁶)	0.69 (0.55- 0.85)
rs12444979, rs999460, rs6732220	C rs12444979 совместно с A rs999460 совместно с G rs6732220	182/877	20.75	257/957	26.85	0.001 (0.0006)	0.71 (0.57- 0.89)
rs999460, rs6732220	A rs999460 совместно с G rs6732220	194/897	21.63	266/964	27.59	0.001 (0.005)	0.72 (0.58- 0.89)
rs12444979, rs2241423	C rs12444979 совместно с G rs2241423	842/878	95.90	894/954	93.71	0.02 (0.05)	1.57 (1.03- 2.40)

Примечания: n – количество индивидуумов с данным сочетанием генетических вариантов; N – общее количество индивидуумов, изученных по данным генетическим полиморфизмам.

Установлено, что комбинации из трех генетических вариантов A rs999460 с G rs2241423 с G rs6732220 и C rs12444979 с A rs999460 с G rs6732220 встречаются среди контрольной группы (27.43% и 26.85%, соответственно) в 1.29-1.33 раз чаще, чем среди пациенток с ГПМ (20.63%, Pperm=6.3*10⁻⁶ и 20.75%, Pperm=0.0006, соответственно). При наличии этих сочетаний полиморфных маркеров риск развития ГПМ снижен (OR=0.69 и OR=0.71, соответственно). Аналогичной направленности различия зарегистрированы по комбинации из двух генетических вариантов A rs999460 с G rs6732220. Среди больных с ГПМ зарегистрирована наименьшая частота данного сочетания (21.63%) по сравнению с контролем (27.59%, Pperm=0.005, OR=0.72).

Кроме того, выявлена ассоциация сочетания аллелей C rs12444979 с G rs2241423 с формированием ГПМ: у 95.90% пациенток с ГПМ зарегистрировано данное сочетание генетических маркеров, а в контрольной группе этот показатель составил 93.71% (Pperm=0.05, OR=1.57, 95% CI 1.03-2.40).

В результате биоинформатического анализа частот аллелей и генотипов изученных генов между больными с ГПМ и контрольной группой было установлено, что фактором риска возникновения данной патологии является сочетание аллелей C rs12444979 с G rs2241423 (OR=1.57).

В большом количестве литературных источников показана связь данных генов с формированием метаболических расстройств (в том числе ожирения) [Mei et al., 2012; Rask-Andersen et al., 2012; Yang et al., 2013] и вследствие этого они ассоциированы с ранним возрастом менархе и могут являться фактором риска развития ГПМ [Demerath et al., 2013].

Заключение. Таким образом, в результате проведенного исследования установлено, что риск развития гиперпластических процессов матки у женщин Центрального региона России повышает



комбинация аллелей C rs12444979 с G rs2241423 (OR=1.57), а протективными свойствами обладают сочетания следующих молекулярно-генетических маркеров: C rs12444979 с A rs999460 с G rs2241423 с G rs6732220 (OR=0.67), A rs999460 с G rs2241423 с G rs6732220 (OR=0.69), C rs12444979 с A rs999460 с G rs6732220 (OR=0.71) и A rs999460 с G rs6732220 (OR=0.72).

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ «Изучение вовлеченности генетических полиморфизмов, связанных с возрастом менархе, в развитии гиперпластических процессов матки у населения Центрального Черноземья России».

Литература

- Реброва О.Ю., 2006. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М., Медиасфера, 305.
- Churnosov M.I., Altuchova O.B., Demakova N.A., Krivoshei I.V., Evdokimov V.I., Batlutskaya I.V., Polonikov A.V., 2014. Associations of Cytokines Genetic Variants with Myomatous Knots Sizes. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical*, 5(6): 1344-1347.
- Demerath E.W., Liu C.-T., Franceschini N., Chen G., Palmer J.R., Smith E.N., Chen C.T.L., Ambrosone C.B. et al., 2013. Genome-wide association study of age at menarche in African-American women. *Hum Mol Genet*, 22(16): 3329–3346.
- Donato N.D., Seracchioli R., 2014. How to Evaluate Adenomyosis in Patients Affected by Endometriosis? Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4146361/> (accessed 12.08.2014).
- Elks C. E., Perry J. R. B., Sulem P., Chasman D. I., Franceschini N., He C., Lunetta K. L et al., 2010. Thirty new loci for age at menarche identified by a meta-analysis of genome-wide association studies. *Nat Genet*, 42(12): 1077–1085.
- Favorov A.V., Andreevski T.V., Sudomoina M.A., Favorova O.O., Parmigiani G., Ochs M. F., 2005. A Markov chain Monte Carlo technique for identification of combinations of allelic variants underlying complex diseases in humans. *Genetics*, 171(4): 2113–2121.
- Kim J.J., Kurita T., Bulun S. E., 2013. Progesterone Action in Endometrial Cancer, Endometriosis, Uterine Fibroids, and Breast Cancer. *Endocrine Reviews*, 34(1): 130–162.
- Klatsky P.C., Tran N.D., Caughey A.B., Fujimoto V.Y., 2008. Fibroids and reproductive outcomes: a systematic literature review from conception to delivery. *American journal of obstetrics and gynecology*, 198(4): 357–366.
- Mei H., Chen W., Jiang F., He J., Srinivasan S., Smith E.N., Schork N., Murray S., Berenson G.S., 2012. Longitudinal Replication Studies of GWAS Risk SNPs Influencing Body Mass Index over the Course of Childhood and Adulthood. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3280302/> (accessed 12.02.2012).
- Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F., 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research*, 16(3): 1215–1221.
- Pachomov C.P., Altuchova O.B., Demakova N.A., Krivoshei I.V., Kolesnikov Y.V., Sobyanin F.I., 2014. Study of Cytokines Polymorphous Loci Connections with Rise of Endometrium Proliferative Diseases. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical*, 5(6): 1473–1476.
- Rask-Andersen M., Jacobsson J. A., Moschonis G., Ek A.E., Chrousos G.P., Marcus C., Manios Y., Fredriksson R., Schiöth H. B., 2012. The MAP2K5-linked SNP rs2241423 is associated with BMI and obesity in two cohorts of Swedish and Greek. *BMC Med Genet*, 13: 36–39.
- Tan N. 2014. Women seeking second opinion for symptomatic uterine leiomyoma: role of comprehensive fibroid center. *Journal of Ther Ultrasound*, 2. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4265989/> (accessed 15.04.2014).
- Taran F.A., Weaver A.L., Coddington C.C., Stewart E.A., 2014. Characteristics indicating adenomyosis coexisting with leiomyomas: a case–control study. *Hum Reprod*, 25(5): 1177–1182.
- Truskinovsky A.M., Lifschitz-Mercer B., Czernobilsky B., 2014. Hyperplasia and carcinoma in secretory endometrium: a diagnostic challenge. *Gynecological Pathology*, 33(2): 107–113.
- Yang T.-L., Guo Y., Li S.M., Li S.K., Tian Q., Liu Y.-J., Deng H.-W., 2013. Ethnic differentiation of copy number variation on chromosome 16p12.3 for association with obesity phenotypes in European and Chinese populations. *J. Obes (Lond)*, 37(2): 188–190.



Literature

- Rebrova O. Yu., 2006. Statistical analysis of medical data. Application software package Statistica. Moscow, Media Sfera, 305. (in Russian).
- Churnosov M.I., Altuchova O.B., Demakova N.A., Krivoshei I.V., Evdokimov V.I., Batlutskaya I.V., Polonikov A.V., 2014. Associations of Cytokines Genetic Variants with Myomatous Knots Sizes. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical*, 5(6): 1344-1347.
- Demerath E.W., Liu C.-T., Franceschini N., Chen G., Palmer J.R., Smith E.N., Chen C.T.L., Ambrosone C.B. et al., 2013. Genome-wide association study of age at menarche in African-American women. *Hum Mol Genet*, 22(16): 3329–3346.
- Donato N.D., Seracchioli R., 2014. How to Evaluate Adenomyosis in Patients Affected by Endometriosis? Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4146361/> (accessed 12.08.2014).
- Elks C. E., Perry J. R. B., Sulem P., Chasman D. I., Franceschini N., He C., Lunetta K. L et al., 2010. Thirty new loci for age at menarche identified by a meta-analysis of genome-wide association studies. *Nat Genet*, 42(12): 1077–1085.
- Favorov A.V., Andreewski T.V., Sudomoina M.A., Favorova O.O., Parmigiani G., Ochs M. F., 2005. A Markov chain Monte Carlo technique for identification of combinations of allelic variants underlying complex diseases in humans. *Genetics*, 171(4): 2113–2121.
- Kim J.J., Kurita T., Bulun S. E., 2013. Progesterone Action in Endometrial Cancer, Endometriosis, Uterine Fibroids, and Breast Cancer. *Endocrine Reviews*, 34(1): 130–162.
- Klatsky P.C., Tran N.D., Caughey A.B., Fujimoto V.Y., 2008. Fibroids and reproductive outcomes: a systematic literature review from conception to delivery. *American journal of obstetrics and gynecology*, 198(4): 357–366.
- Mei H., Chen W., Jiang F., He J., Srinivasan S., Smith E.N., Schork N., Murray S., Berenson G.S., 2012. Longitudinal Replication Studies of GWAS Risk SNPs Influencing Body Mass Index over the Course of Childhood and Adulthood. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3280302/> (accessed 12.02.2012).
- Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F., 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research*, 16(3): 1215–1221.
- Pachomov C.P., Altuchova O.B., Demakova N.A., Krivoshei I.V., Kolesnikov Y.V., Sobyenin F.I., 2014. Study of Cytokines Polymorphous Loci Connections with Rise of Endometrium Proliferative Diseases. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical*, 5(6): 1473–1476.
- Rask-Andersen M., Jacobsson J. A., Moschonis G., Ek A.E., Chrousos G.P., Marcus C., Manios Y., Fredriksson R., Schiöth H. B., 2012. The MAP2K5-linked SNP rs2241423 is associated with BMI and obesity in two cohorts of Swedish and Greek. *BMC Med Genet*, 13: 36–39.
- Tan N. 2014. Women seeking second opinion for symptomatic uterine leiomyoma: role of comprehensive fibroid center. *Journal of Ther Ultrasound*, 2. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4265989/> (accessed 15.04.2014).
- Taran F.A., Weaver A.L., Coddington C.C., Stewart E.A., 2014. Characteristics indicating adenomyosis coexisting with leiomyomas: a case–control study. *Hum Reprod*, 25(5): 1177–1182.
- Truskinovsky A.M., Lifschitz-Mercer B., Czernobilsky B., 2014. Hyperplasia and carcinoma in secretory endometrium: a diagnostic challenge. *Gynecological Pathology*, 33(2): 107–113.
- Yang T.-L., Guo Y., Li S.M., Li S.K., Tian Q., Liu Y.-J., Deng H.-W., 2013. Ethnic differentiation of copy number variation on chromosome 16p12.3 for association with obesity phenotypes in European and Chinese populations. *J. Obes (Lond)*, 37(2): 188–190.